Iranian Journal of Animal Science Research
Homepage: http://ijasr.um.ac.ir

Research Paper
Vol. 14, No. 2, Summer 2022, p. 221-236

Comparative effects of *Mentha piperita* extract, vitamin E, vitamin C, probiotic and antibiotic on performance and immune response of broilers under heat stress

Zeinab Palizban[1], Kamran Taherpour[1*], Mohammad Akbari Gharaei[1], Hossein Ali Ghasemi[2], Jabar Jamali[1]

Received: 06-03-2021 Revised: 07-08-2021 Accepted: 22-05-2021 Available Online: 14-09-2022	**How to cite this article:** Palizban, Z., K. Taherpour, M. Akbari Gharaei, H. A. Ghasemi and J. Jamali. 2022. Comparative effects of *Mentha piperita* extract, vitamin E, vitamin C, probiotic and antibiotic on performance and immune response of broilers under heat stress. Iranian Journal of Animal Science Research, 14(2):221-236. DOI: 10.22067/ijasr.2021.69269.1012

Introduction This experiment was performed to evaluate the effects of peppermint extract, vitamins C, vitamin E, probiotics and antibiotics on performance, biochemical parameters and immune system of broilers under heat stress conditions. Peppermint (*Mentha piperita*) is considered as one of these medical plants and belongs to the *Lamiaceae* family. The essential oils and extracts of this plant are mainly made up of menthone, menthol and methyl acetate. Peppermint is traditionally used as an antiseptic, antispasmodic, mild tonic, antimicrobial.

Materials and Methods A total of 240 one-day-old broilers (Ross 308) were distributed to 8 treatments with 5 replications/treatment based on a randomized block design. Experimental diets consisted of base diet without feed additive and under standard temperature conditions (negative control), base diet without feed additive and under heat stress conditions (positive control), positive control supplemented with 28 mg/kg virginiamycin, 28 mg/kg probiotic protexin, 1 g/kg vitamin C, 1 g/kg vitamin E, 250 and 500 mg/kg peppermint extract, respectively. House temperature was initially set at 28°C for the second week and then reduced by 0.5°C per day until a temperature of 22°C was achieved at the end of the fourth week and then maintained constant thereafter. To induce heat stress, room temperature was raised to 34°C during 10 AM to 16 PM from 15 to 42 days of age. A 23:1h light to darkness lightening regimen was followed throughout the experimentation period. Body weight gain and feed intake were recorded for days 10, 24 and 42 of age and data were used to calculate feed conversion ratio (FCR). At the end of the experiment (day 42), two birds from each replication with a body weight close to cage mean were selected and killed. Individual blood samples were collected form the slaughtered birds and centrifuged at 1800× g for 15 min. The collected sera samples stored at -20°C pending biochemical assessments. Concentrations of serum glucose, triglyceride, total cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), very- low-density lipoprotein cholesterol (VLDL-C), white blood cells (WBC), red blood cells (RBC), Hematocrit and Hemoglobin were determined by different recommended procedures. To assay the primary and secondary antibody responses against SRBC, 2 birds/replicate were immunized intramuscularly with 0.5 mL 10% SRBC in. Blood samples (1.5 mL/bird) were obtained from the brachial vein at 7d following each injection.

Results and Discussion The results showed that the highest feed intake and feed conversion ratio were observed in chickens fed with negative control diets ($P < 0.05$). The greatest body weight was observed in the birds fed with the negative control and diets supplemented with probiotics and vitamin E ($P < 0.05$). Broilers fed with diets containing

1- Former MSc student, Associate professor, Assistant Professor, and Assistant Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran.
2- Associate professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture and Environment, Arak University, Arak, Iran.
[*] Corresponding Author Email: k.taherpour@ilam.ac.ir; kamran_taherpour@yahoo.com

antibiotics as same as positive control group could increase abdominal fat percentage and serum triglycerides concentration than other treatments (P <0.05). The broilers fed with diets supplemented with all feed additives decreased the heterophils to lymphocytes ratio compared to the positive control group (P <0.05). The probiotics and 500 mg peppermint extract-supplemented diets improved the antibody titer against Newcastle, Gumburo and influenza diseases, as well as anti-SRBC titer, compared to the positive control group (P <0.05). The results of this study are supported by other studies, indicating that the dietary supplementation of probiotic could improve physiological responses and immune system and thus performance of heat-stressed birds. Dietary supplementation of vitamin C is an effective strategy to reduce the harmful effects of heat stress in poultry. The results of previous studies have demonstrated that the antioxidant and inflammatory properties of peppermint contributes to the prevention and treatment of diseases associated with oxidative stress, through removing free radical. Medicinal plants with secondary metabolites have also reported to possess the positive effects on growth performance and thus increasing the immune function. The positive effects of peppermint could be due to its active ingredients such as carvacrol, flavonoids and menthol. Flavonoids with antioxidant effects have protective properties against free radicals. The mucous membrane of the gastrointestinal tract plays an important role in preventing antigens and harmful microorganisms from entering the organ and eliminating them, while also being effective in selective nutrient absorption. The results of the present experiment and the other reports also indicate that dietary supplementation of probiotic and vitamin E and C and peppermint extract improve the immune response and growth performance of broilers and could be account as an alternative to antibiotics.

Conclusion In conclusion, a high dose of peppermint (500 mg/kg) was as effective as probiotic, vitamin E and C in alleviating the negative effects of heat stress on growth performance, health and immune function.

Keywords: Broilers, Heat stress, Immune response, Peppermint extract, Performance

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
Homepage: https://ijasr.um.ac.ir/

مقاله پژوهشی

مقایسه اثرات عصاره نعناع فلفلی، ویتامین C، ویتامین E، پروبیوتیک و آنتی‌بیوتیک بر عملکرد و پاسخ ایمنی جوجه‌های گوشتی تحت تنش گرمایی

زینب پالیزبان[1]، کامران طاهرپور*[1]، محمد اکبری قرائی[1]، حسینعلی قاسمی[2]، جبار جمالی[1]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۱۶
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۵/۱۶
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۵/۳۱

پالیزبان، ز.، ک. طاهرپور، م. اکبری قرائی، ح. قاسمی و ج. جمالی. ۱۴۰۱. مقایسه اثرات عصاره نعناع فلفلی، ویتامین C، ویتامین E، پروبیوتیک و آنتی‌بیوتیک بر عملکرد و پاسخ ایمنی جوجه‌های گوشتی تحت تنش گرمایی. پژوهشهای علوم دامی ایران ۱۴(۲):۲۳۶-۲۲۱.

چکیده

این آزمایش به منظور بررسی اثرات عصاره نعناع فلفلی، ویتامین C و E، پروبیوتیک و آنتی‌بیوتیک بر عملکرد، پارامترهای بیوشیمیایی خون و پاسخ ایمنی جوجه‌های گو شتی تحت شرایط تنش گرمایی انجام گرفت. ۲۴۰ جوجه گو شتی یکروزه (راس ۳۰۸) در ۸ تیمار و ۵ تکرار به ازای هر تیمار توزیع شدند. گروه‌های آزمایشی شامل جیره پایه بدون افزودنی و تحت شرایط دمای استاندارد (شاهد منفی)، جیره پایه بدون افزودنی و تحت شرایط تنش گرمایی (شاهد مثبت)، شاهد مثبت مکمل شده به ترتیب با ۲۵ میلی‌گرم در کیلوگرم ویرجینیامایسین، ۲۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم پروبیوتیک پروتکسین، ۵۰۰ میلی‌گرم درکیلوگرم ویتامین C، ۲۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین E، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم عصاره نعناع فلفلی بود. نتایج نشان داد که گروه‌های شاهد منفی، پروبیوتیک و ویتامین E وزن بدن بیشتری در مقایسه با گروه شاهد مثبت داشتند. همه تیمارهای آزمایشی به استثنای تیمار آنتی‌بیوتیک در مقایسه با تیمار شاهد مثبت موجب بهبود ضریب تبدیل خوراک شدند (P<۰/۰۵). بالاترین میزان تری‌گلیسرید سرم و چربی حفره شکمی در گروه‌های آنتی‌بیوتیک و شاهد مثبت مشاهده شد (P<۰/۰۵). افزودنی‌های خوراکی سبب کاهش نسبت هتروفیل به لنفوسیت خون نسبت به گروه شاهد مثبت شد (P<۰/۰۵). همچنین استفاده از پروبیوتیک و ۵۰۰ میلی‌گرم عصاره نعناع فلفلی موجب بهبود تیتر آنتی‌آبادی علیه نیوکاسل، گامبورو و آنفلوآنزا و SRBC نسبت به گروه شاهد مثبت شدند (P<۰/۰۵). به عنوان نتیجه‌گیری کلی، استفاده از ۵۰۰ میلی‌گرم عصاره نعناع فلفلی مشابه ویتامین E، ویتامین C و پروبیوتیک با بهبود سیستم ایمنی و عملکرد رشد می‌تواند در جیره جوجه‌های تحت تنش گرمایی مفید باشد.

واژه‌های کلیدی: پاسخ ایمنی، تنش گرمایی، جوجه‌های گوشتی، عصاره نعناع فلفلی، عملکرد

مقدمه

در صنعت طیور رفاه و آسایش پرندگان نقش بسیار مهمی بر بازدهی اقتصادی دارد، زیرا سلامتی طیور در نتیجه شرایط مناسب پرورش، اثر قابل توجهی بر سیستم ایمنی و در نتیجه عملکرد آنها خواهد داشت. وجود یک سیستم ایمنی مناسب باعث ایجاد مقاومت در برابر بیماری‌ها می‌شود. امروزه به دلیل شرایط پرورش، صنعت طیور با بسیاری از عوامل استرس‌زای مؤثر بر کاهش عملکرد مانند تنش گرمایی روبرو هستند (Khodadust *et al*., 2015). دما، یکی از عوامل محیطی تأثیرگذار بر عملکرد تولید و کیفیت گوشت طیور می‌باشد. وقتی دمای محیط از منطقه آسایش بالاتر رود تنش گرمایی رخ می‌دهد که

۱- بترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیار، استادیار و استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران.
۲-دانشیار تغذیه طیور، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه اراک، اراک، ایران.
(*- نویسنده مسئول: (Email: k.taherpour@ilam.ac.ir;

DOI: 10.22067/ijasr.2021.69269.1012

در این شرایط، پرندگان با استفاده از انرژی بدن، خود را خنک می‌کنند، که این باعث کاهش عملکرد و عدم تعادل هورمونی و بیوشیمیایی و میزان اکسیدان و آنتی اکسیدانت‌ها در طیور می‌شود، و تولید گونه‌های فعال اکسیژنی، کاهش فعالیت دفاع آنتی‌اکسیدانی سلولی و آسیب به بیومولکول‌ها را در پی دارد (Lin *et al*., 2006). همچنین بدلیل نقش سیستم قلبی-ریوی در تنظیم دمایی بدن، با افزایش دمای محیط تغییرات فیزیولوژیکی از جمله تعادل اسید-باز، pH خون، آلکالوز تنفسی و کاهش سطح ویسکوزیته خون، هماتوکریت و غلظت پروتئینی پلاسمایی اتفاق می‌افتد (Borges *et al*., 2004) و احتمالا متابولیسم چربی‌ها را در بافت چربی کبد نیز تغییر می‌دهد. در یک مطالعه (Sohail *et al*., 2012)، گزارش شد که تنش گرمایی به طور قابل توجهی باعث کاهش وزن و مصرف خوراک و افزایش نسبت ضریب تبدیل خوراک در جوجه‌های گوشتی در سن ۴۲ روزگی می‌گردد. راهکارهای متعددی از جمله شرایط مدیریتی، دستکاری جیره‌ای و همچنین افزودن مکمل-های خوراکی در جیره (ویتامین‌ها، مواد معدنی، پروبیوتیک، فیتوژنیک‌ها و ...) جهت مقابله با اثرات منفی ناشی از تنش گرمایی در جوجه‌های گوشتی پیشنهاد شده است (Lara *et al*., 2013). مطالعات زیادی اثرات مثبت ویتامین‌ها در جیره را بر کاهش استرس اکسیداتیو و بهبود عملکرد رشد جوجه‌های گوشتی گزارش کردند (Habibian *et al*., 2014; Dalólio *et al*., 2015). ویتامین E وC به عنوان آنتی‌اکسیدان، نقش محافظتی در برابر گونه‌های فعال اکسیژن ناشی از استرس اکسیداتیو در شرایط تنش گرمایی دارند. تنش گرمایی باعث افزایش غلظت مالون دی آلدئید در کبد و سرم می‌شود، استفاده از ویتامین E با کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و آسیب سلولی، تولید مالون دی الدئید را کاهش داده و سبب بهبود عملکرد طیور می‌شود (Habibian *et al*., 2014).

با منع استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های محرک رشد، استفاده از افزودنی-های خوراکی در طیور در بسیاری از مطالعات مد نظر قرار گرفته‌اند که ضمن بهبود وضعیت دستگاه گوارشی فاقد اثرات سوء بهداشتی و زیست محیطی هستند (Tavakolinasab and Taherpour, 2017). پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که با تثبیت در روده حیوان باعث ایجاد تعادل در جمعیت میکروفلور روده شده و با اثرات ضد میکروبی، تأثیر مثبتی بر عملکرد حیوان، سیستم ایمنی و آنتی-اکسیدانی دارند (Liao *et al*., 2015). لیائو و همکاران (Liao *et al*., 2015) گزارش کردند که پروبیوتیک‌ها می‌توانند باعث بهبود عملکرد خوراک و مهار پاتوژن‌ها در طیور شوند و به طور مثبتی سلامت و عملکرد را تحت تأثیر قرار دهند. در یک مطالعه (Landy and Kavyani, 2013)، افزودن مکمل پروبیوتیک چند سویه (پریمالاک) در سطح ۰/۹ گرم در کیلوگرم جیره موجب افزایش مقاومت پرنده در مقابل تنش حرارتی از طریق بهبود عملکرد رشد، پاسخ ایمنی و جمعیت میکروبی دستگاه گوارش می‌شود. همچنین در یک مطالعه در جوجه-های گوشتی، استفاده از مکمل ویرجینیامایسین در جیره غذایی سبب بهبود میانگین افزایش وزن جوجه‌های گوشتی در شرایط تنش حرارتی شد (Rahimi and Khaksefidi, 2006).

از انجایی که آنتی‌اکسیدانت‌ها در شرایط استرس اکسیداتیو کاهش می‌یابند و پرندگان در این شرایط قادر به تولید آنتی‌اکسیدان نیستند، امروزه استفاده از ترکیبات فیتوژنیکی بدلیل داشتن عملکردهای فارماکولوژی متعدد از جمله اثرات آنتی اکسیدانی، اثرات ضد میکروبی، کاهش مرگ و میر و بهبود عملکرد رشد در طیور توجه زیادی را در بین محققین بخود جلب کرده‌اند (Tavakolinasab and Taherpour, 2017). نعناع فلفی با نام علمی *Mentha piperita* L یکی از گیاهان مهم خانواده نعناعیان می‌باشد که به دلیل ترکیب منتول و خواص درمانی آن دارای ارزش دارویی زیادی می‌باشد. از دیگر ترکیبات شیمیایی نعناع فلفی منتون، ۱، ۸- سینئول، متیل استات، متفورم، ایزومنتون، لیمونن می‌باشد (Asadi *et al*., 2017). اگرچه مطالعات زیادی اثرات مثبت نعناع فلفی بر عملکرد جوجه‌های گوشتی و کاهش کلسترول، تری‌گلیسرید و گلوکز را گزارش کردند (Akbari and Torki, 2014; Khodadust *et al*., 2015)، اما مطالعه کمی در زمینه استفاده از عصاره این گیاه دارویی و مقایسه آن با مکمل‌های رایج غذایی در تغذیه جوجه‌های گوشتی در شرایط تنش گرمایی وجود دارد. بنابراین، هدف از این مطالعه مقایسه اثرات استفاده از آنتی‌بیوتیک، پروبیوتیک، ویتامین E و C و عصاره نعناع فلفی در جیره غذایی بر عملکرد و سیستم ایمنی جوجه‌های گوشتی تحت شرایط تنش گرمایی بود.

مواد و روش‌ها

این آزمایش با استفاده از ۲۴۰ جوجه گوشتی یکروزه سویه راس (۳۰۸) در هشت تیمار و پنج تکرار با ۶ پرنده به ازای هر تکرار در قالب طرح بلوک کامل تصادفی انجام گرفت. جوجه‌ها از روز اول به طور تصادفی بین یکی از هشت تیمار آزمایشی شامل ۱) جیره پایه بدون ماده افزودنی و تحت شرایط دمای استاندارد (شاهد منفی)، ۲) جیره پایه بدون ماده افزودنی و تحت شرایط استرس حرارتی (شاهد مثبت)، ۳) شاهد مثبت + ۲۵ میلی‌گرم در کیلوگرم آنتی‌بیوتیک ویرجینیامایسین ۴) شاهد مثبت + ۲۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم پروبیوتیک پروتکسین (Protexin® Boost)، ۵) شاهد مثبت + ۵۰۰ میلی‌گرم درکیلوگرم ویتامین C، ۶) شاهد مثبت + ۲۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین E، ۷) شاهد مثبت + ۲۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم عصاره نعناع فلفلی ۸) شاهد مثبت + ۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم عصاره نعناع فلفلی توزیع شدند. در تمام دوره آزمایش، پرندگان به صورت آزاد به آب و خوراک دسترسی داشتند. برنامه نوری ۲۳ ساعت روشنایی و ۱ ساعت تاریکی در سراسر دوره آزمایش فراهم شد. آزمایش در دو اتاق با شرایط قابلیت کنترل دما انجام شد. هر اتاق مجهز به بخاری‌های برقی (۲۰۰۰ وات) قابل حمل

با کنترل ترموستات بود که هرکدام دارای فن برای گردش هوای گرم بودند. رطوبت نسبی که با یک رطوبت ساز (ظرفیت ۴/۵ لیتر) در داخل اتاق ها فراهم می شد، در طول دوره آزمایش بین ۵ ± ۶۰ بود. تهویه و حرارت محیط در تمام مراحل آزمایش برای پرندگان گروه شاهد منفی مطابق با توصیه‌های راهنمای پرورش سویه راس بود. به منظور اعمال تنش حرارتی از ساعت ۱۰ تا ساعت ۱۶ دمای سالن به ۳۴ درجه سانتیگراد از روز ۱۵ پرورش تا پایان دوره آزمایش افزایش یافت. میانگین مدت زمان افزایش حرارت محیط از ۲۲ به ۳۴ درجه سانتیگراد حدود ۳۰ دقیقه بود (Amiri *et al*., 2019).

برای تهیه عصاره نعناع فلفلی، نخست مقداری برگ خشک شده نعناع فلفلی آسیاب شد. سپس با اتانول ۸۷ درصد مخلوط و بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون در اتاق تاریک، فیلتر و در آخر توسط دستگاه تبخیر کننده چرخان (Rotary evaporate) تغلیظ شد تا عصاره بدون الکل حاصل شود. پس از آن عصاره مورد نظر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در پایان عصاره یخ زده توسط دستگاه سرما خشک کن (SuperModulyo Freeze Dryer, Thermo Electron Corporation, Edwards, Asheville, NC) به پودر تبدیل شد. محتوان کل فنل و کل فلاونوئید بر اساس روش کالریمتریک اندازه-گیری شد (Fazelinasab *et al*., 2019). به منظور بررسی اثرات آنتی-اکسیدانی عصاره، آزمون مهار رادیکال دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH; 2,2-diphenyl-1- picrylhydrazyl) انجام شد و نتایج حاصله مورد بررسی قرارگرفت. محلول عصاره با غلظت معین ساخته شد. سپس ۴۰ میکرولیتر از غلظت‌های متفاوت عصاره اتانولی (۳ تا ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به ۱ میلی‌لیتر از محلول DPPH مخلوط شد (Farnad *et al*., 2014). بعد از آن جذب نمونه‌ها در ۵۱۷ نانومتر توسط اســـپکتروفتومتر (Spectramax Gemini XS; Molecular Devices, Sunnyvale, CA) انـدازه‌گیری شد. بتاهیدروکسی تولوئن (BHT) هم به‌عنوان آنتی‌اکسیدان سنتتیک به‌عنوان کنترل مثبت تهیه گردید. میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (Akhbari *et al*., 2012):

$$\text{درصد مهار رادیکال آزاد} = (A_C - A_S) / A_C \times 100$$

در این فرمول A_C میزان جذب کنترل و A_S میزان جذب نمونه است.

برای تعیین نیاز غذایی جوجه‌ها در دوره‌های مختلف پرورش۱ تا ۱۰ روزگی (دوره اغازین)، ۱۱ تا ۲۴ روزگی (دوره رشد) و ۲۵ تا ۴۲ روزگی (دوره پایانی) و همچنین برآورد مواد مغذی اجزای جیره از راهنمای سویه، استفاده شد. اجزای جیره‌های آزمایشی در جدول ۱ آمده است.

در طول دوره آزمایش، وزن بدن پرندگان و خوراک مصرفی در دوره‌های مختلف پرورش جمع‌آوری و ضریب تبدیل خوراک به عنوانی نسبتی از خوراک مصرفی به وزن بدن، در پایان هر دوره ۱ تا ۱۰ روزگی، ۱۱ تا ۲۴ روزگی، ۲۵ تا ۴۲ روزگی و برای کل دوره ۱ تا ۴۲ روزگی محاسبه و گزارش شدند. همچنین جهت محاسبه شاخص کارایی تولید در کل دوره پرورشی از رابطه ۱ استفاده شد.

(رابطه ۱) ۱۰۰×[(سن کشتار × ضریب تبدیل غذایی)/(درصد ماندگاری × میانگین وزن کشتار)] = شاخص کارایی تولید

در پایان شش هفتگی، ۲ قطعه جوجه از هر تکرار به صورت تصادفی انتخاب و کشتار انجام گرفت. اندام‌های لمفوئیدی طحال، بورس فابرسیوس و تیموس (بعد از خارج کردن دقیق همه لب‌های تیموس از ناحیه دو طرف گردن و در طول ورید وداج) بصورت جداگانه با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ وزن شدند. پس از پایان دوره آزمایش و قبل از کشتار به منظور ارزیابی شاخص سلول‌های خونی، هموگلوبین و پارامترهای بیوشیمیایی، خونگیری از ورید بال پرنده انجام و بعد از انتقال به میکروتیوپ، جهت جداسازی سرم به مدت ۱۰ دقیقه و با سرعت ۱۵۰۰×g سانتریفوژ شدند. سرم جمع‌آوری شده تا زمان انجام آزمایشات در فریزر منفی ۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. غلظت تری‌گلیسرید، کلسترول کل، لیپوپروتئین‌های با دانسیته بالا (HDL)، لیپوپروتئین‌های با دانسیته پائین (LDL)، پروتئین کل و گلوکز خون با استفاده روش ایلیبوت (Elliott, 1984) با استفاده از کیت‌های تجاری اندازه‌گیری شدند. جهت شمارش افتراقی گلبول‌های سفید، نمونه‌های خون گرفته شده (۲ پرنده به ازای هر تکرار) در لوله‌های حاوی اتیلن دی آمین تترااستیک اسید (EDTA) جمع‌آوری شد. بعد از تهیه گسترش خونی و رنگ‌آمیزی گیمسا، شمارش هتروفیل و لنفوسیت نمونه‌های خون از طریق مشاهده با میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰۰ با روغن ایمرسیون شمارش شدند (Lucas and Jamroz, 1961) و نسبت هتروفیل به لنفوسیت نیز محاسبه شد. برای بررسی پاسخ ایمنی هومورال جوجه‌ها، تیتر آنتی بادی علیه بیماری نیوکاسل، گامبورو و آنفلوآنزا با روش هماگلوتیناسیون (HI) با استفاده از روش پورحسینی و همکاران (Pourhosseini *et al*., 2014) اندازه-گیری شدند. برنامه واکسیناسیون بر علیه بیماری‌های نیوکاسل، آنفلوآنزا و گامبورو طبق توصیه اداره دامپزشکی منطقه انجام شد. بدین منظور ۱۰ و ۲۰ روز پس از آخرین واکسیناسیون به صورت آشامیدنی علیه بیماری نیوکاسل (۱۲ روزگی) و گامبورو (۱۹ روزگی) و تزریق زیر پوستی واکسن ویروس آنفلوآنزا (۶ روزگی)، دو جوجه در هر تکرار به صورت تصادفی انتخاب و خونگیری انجام شد. همچنین تزریق ۰/۲۵ میلی‌لیتر سلول‌های خون قرمز گوسفندی (SRBC) ۱۰ درصد (در محلول بافر فسفات) نیز به صورت تزریق عضلانی در ۳۰ و ۳۶ روزگی انجام گرفت و یک هفته بعد از هر تزریق نمونه‌های خون برای جداسازی سرم به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰×g سانتریفیوژ شدند (Rostami *et al*., 2015).

جدول ۱- ترکیب جیره‌های آزمایشی

Table 1- The composition of experimental diet

	1-10 days	11-24 days	25-42 days
اجزای خوراکی(%) Ingredients (%)			
ذرت Corn	570.0	603.9	649.1
کنجاله سویا (۴۴٪ -Cp) Soybean meal (44 % CP)	327.1	306.9	273.9
پودر ماهی Fish meal	56.6	43.1	26.2
دی کلسیم فسفات Di calcium phosphate	19.4	23.8	29.0
پودر صدف Oyster meal	11.6	9.6	9.4
مکمل معدنی و ویتامینی [1] Mineral and vitamin premix[1]	5.0	5.0	5.0
جوش شیرین $NaHCO_3$	1.6	1.4	1.4
نمک Salt	2.1	2.4	2.7
دی ال-متیونین DL- Methionine	2.8	1.9	1.4
کولین کلراید Choline chloride	1.8	1.5	1.5
ال- لیزین هیدروکلراید L-Lysine HCL	2.0	0.5	0.4
انرژی قابل متابولیسم (کیلوکالری بر کیلوگرم) Metabolizabe energy (kcal/kg)	2945	3000	3075
پروتئین خام (درصد) Crude protein (%)	23.7	19.3	17.8
کلسیم (درصد) Calcium (%)	1.25	0.97	0.90
فسفر قابل دسترس (درصد) Available phosphorus (%)	0.60	0.46	0.40
لیزین قابل هضم (درصد) Digestible lysine (%)	1.31	1.27	1.26
متیونین+سیسئین قابل هضم (درصد) Digestible Methionine + cystine	0.90	0.80	0.69
تعادل الکترولیتی جیره[۲] DEB[2]	250	235	225

[۱] هر کیلوگرم جیره حاوی: ویتامین A ۶۰۰ واحد بین المللی، ویتامین D۳ ۸۰۰ واحد بین المللی، ویتامین E ۸۳ میلی‌گرم، ویتامین K3 ۲/۲ میلی‌گرم،ویتامین B1 ۱/۸ میلی گرم، B2 ۶/۶ میلی‌گرم، B3 ۳ میلی‌گرم،کلسیم د- پنتوتنات ۱۰ میلی‌گرم، B6 ۳ میلی گرم، B9 ۱ میلی‌گرم، B12 ۶ میلی‌گرم و ۱۶۰ میلی گرم، کولین کلرید ، منگنز ۱۲۰ میلی‌گرم، روی ۱۰۰ میلی‌گرم، آهن ۴ میلی گرم، مس ۱۶ میلی‌گرم، ید ۱ میلی‌گرم و سلنیوم ۰/۸ میلی‌گرم بود.

[۲] تعادل الکترولیتی جیره بر حسب میلی‌اکی‌والان در کیلوگرم جیره (DEB)

[1]Supplied per kilogram of diet: vitamin A, 600 IU; vitamin D_3, 800 IU; vitamin E, 83 mg; vitamin K_3, 2.2 mg; vitamin B_1, 1.8 Mg; vitamin B_2, 6.6 mg; vitamin B_3, 3 mg; D-calcium pantothenic acid, 10 Mg; vitamin B6; 3 mg; vitamin B9; 1 mg, vitamin B12, 6 mg and choline chloride 160 mg, manganese, 120 mg; zinc, 100 mg; iron, 4 mg; copper, 16 mg; iodine, 1 mg; selenium, 0.8 mg.

[2]Dietary Electrolyte Balance= (Na^+, mEq/kg + K^+, mEq/kg) – (CL^-, mEq/kg + SO_4^{-2}, mEq/kg)

نمونه‌های سرم بلافاصله بعد از جداسازی و انتقال به میکروتیوب در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی گراد تا زمان ارزیابی غلظت IgM

و IgG نگهداری شدند. برای تعیین عیار پادتن تولید شده علیه SRBC از روش هماگلوتیناسیون میکروتیتر استفاده شد. نمونه‌های سرم ابتدا جهت پاسخ آنتی‌بادی کل و سپس با استفاده از تکنیک ۲-مرکاپتواتانول برای IgM و IgG مورد آزمایش قرار گرفت (Al-Kassie *et al*., 2004). داده‌های جمع‌آوری شده توسط نرم افزار SAS (SAS Institute, 2001) و با استفاده از رویه GLM مورد تجزیه وتحلیل آماری قرار گرفت و به منظور مقایسه میانگین از آزمون چند دامنه ای دانکن و در سطح ۵ درصد انجام پذیرفت.

نتایج و بحث

برآورد میزان فنول کل و آزمون DPPH:

نتایج آزمایش اندازه‌گیری فنول کل نشان داد که میزان کل فنل و فلاونوئید در عصاره نعناع فلفی مورد استفاده به ترتیب شامل ۲۲/۶ و ۹۸/۲ میلی‌گرم در هر گرم عصاره خشک بود. بر اساس نتایج تست آنتی‌اکسیدانی، مقادیر DPPH در غلظت ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره الکلی نعناع فلفی ۶۷/۶ درصد و برای غلظت ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر BHT ۷۲/۱ درصد بود. مطالعات زیادی روی فعالیت آنتی-اکسیدانی و ضدباکتری خانواده نعناع انجام گرفته است که نشان می‌دهد قدرت زیاد آنتی‌اکسیدانی آن مربوط به وجود ترکیبات فنلی مانند فلاوونوئید است. این ترکیبات دارای خاصیت از بین بردن رادیکال‌های آزاد و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی هستند (Li *et al*., 2017). در مطالعه‌ای که روی خاصیت آنتی‌اکسیدانی نعناع با روش DPPH صورت گرفت، نتایج نشان داد که ماکزیمم DPPH در غلظت ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره متانولی و اتانولی نعناع فلفلی به ترتیب ۶۶/۹۸ و ۸۰/۷۴ درصد بود که قابل قیاس با مقادیر گزارش شده با اسید اسکوربیک (۹۲/۳۰ درصد) و اسید گالیک (۹۳/۰۰ درصد) با غلظت‌های مشابه بود (Farnad *et al*., 2014). یافته‌های حاصل از این آزمایش نشان داد که قدرت مهاری در ممانعت اکسیداسیون در نمونه عصاره تقریبا مشابه نمونه استاندارد بود که نشان‌دهنده خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالای عصاره نعناع فلفلی می‌باشد.

عملکرد پرورشی

نتایج حاصل از تأثیر جیره‌های آزمایشی در دوره‌های مختلف پرورش جوجه‌های گوشتی بر میانگین خوراک مصرفی، میانگین افزایش وزن و ضریب تبدیل غذایی در جدول ۲ آورده شده است. میانگین افزایش وزن کمتر در دوره‌های ۱۱ تا ۲۴ روزگی و همچنین در کل دوره آزمایشی (۱ تا ۴۲ روزگی) و ضریب تبدیل غذایی بالاتر در دوره‌های ۲۵ تا ۴۲ روزگی و کل دوره آزمایشی (۱ تا ۴۲ روزگی) در تیمار شاهد مثبت در مقایسه با تیمار شاهد منفی مشاهده شد (۰/۰۵> P). اگرچه تفاوت معنی‌داری بین تیمار شاهد مثبت و تیمار شاهد منفی از نظر میانگین خوراک مصرفی در دوره‌های مختلف پرورش و همچنین کل دوره آزمایشی وجود نداشت، در مقابل جوجه‌های تغذیه شده با جیره‌های حاوی ویتامین C، E و دو سطح ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌لیتر عصاره نعناع فلفلی میانگین خوراک مصرفی کمتری در مقایسه با گروه شاهد منفی در طی دوره‌های ۲۵ تا ۴۲ روزگی و کل دوره آزمایش نشان دادند (P <۰/۰۵). در ۱۱ تا ۲۴ روزگی، فقط جوجه‌های تغذیه شده با جیره حاوی آنتی‌بیوتیک در مقایسه با جوجه‌های تغذیه شده با گروه شاهد مثبت میانگین افزایش وزن بدن بالاتری داشتند (P <۰/۰۵). میانگین افزایش وزن در کل دوره پرورشی در جوجه‌های دریافت کننده جیره-های مکمل شده با پروبیوتیک و ویتامین E مشابه گروه شاهد منفی و بالاتر از گروه شاهد مثبت بود (P<۰/۰۵). در دوره‌های ۲۵ تا ۴۲ روزگی و همچنین کل دوره آزمایشی، جوجه‌های تغذیه شده با همه تیمارهای آزمایشی حاوی مواد افزودنی به استثنای آنتی‌بیوتیک ضریب تبدیل خوراک کمتری در مقایسه با گروه شاهد مثبت داشتند (P<۰/۰۵)، که از این نظر قابل قیاس با تیمار شاهد منفی بودند. در مورد شاخص عملکرد اروپایی، تیمار شاهد منفی در مقایسه با تیمار شاهد مثبت شاخص عملکرد بالاتری داشتند (P<۰/۰۵). همه تیمارهای آزمایشی حاوی مواد افزودنی شاخص عملکرد بهتری را در مقایسه با تیمار شاهد مثبت داشتند (P<۰/۰۵). همچنین تیمار حاوی ویتامین E ضریب تبدیل غذایی مشابه تیمار شاهد منفی نشان داد که به استثنای تیمارهای حاوی عصاره نعناع فلفلی از بقیه تیمارها بهتر بود (P<۰/۰۵).

همانطور که نتایج نشان داد در کل دوره پرورشی (۴۲-۱ روزگی)، میانگین وزن بدن در جوجه‌های گروه شاهد مثبت کاهش و نسبت ضریب تبدیل خوراک آنها نسبت به تیمار شاهد منفی افزایش یافت، استفاده از افزودنی‌های پروبیوتیک، ویتامین‌ها و عصاره نعناع فلفی در جیره شاهد مثبت، سبب بهبود پارامترهای عملکرد رشد شد. مطالعات زیادی اثرات منفی تنش گرمایی بر عملکرد طیور را گزارش کردند (Lin *et al*., 2006; Khodadust *et al*., 2015). کاهش عملکرد طیور تحت تنش گرمایی می‌تواند در نتیجه عوامل متعددی از جمله کاهش خوراک مصرفی به عنوان یک مکانیسمی جهت کاهش افزایش حرارت بدن (Sohail *et al*., 2012)، اختلال در هضم، کاهش فعالیت آنزیم-های گوارشی و تغییر در وضعیت داخلی بدن در نتیجه افزایش فعالیت هورمون کورتیکوسترون (Sohail *et al*., 2012) ایجاد شود.

جدول ۲- اثر تیمارهای آزمایشی بر فراسنجه‌های عملکرد جوجه‌های گوشتی[1]

Table 2- Effects of different dietary on growth performance parameters in broilers[1]

فراسنجه‌ها Parameters	جیره‌های آزمایشی Experimental diets						عصاره نعناع فلفی Peppermint extract			
	شاهد منفی Negative control	شاهد مثبت Positive control	آنتی‌بیوتیک ویرجیناماسین Antibiotic, virginiamycin	پروبیوتیک پروتکسین Probiotic, protexin	ویتامین-C Vit C	ویتامین-E Vit E	۲۵۰ میلی-گرم 250 mg	۵۰۰ میلی‌گرم 500 mg	اشتباه استاندارد SEM	سطح احتمال P-value
خوراک مصرفی (گرم/پرنده/روز) Feed intake (g/bird/d)										
1-10 d ۱-۱۰ روزگی	23.45	23.45	22.57	22.82	22.55	23.43	22.88	22.17	0.56	0.723
11-24 d ۱۱-۲۴ روزگی	40.76	41.26	41.31	40.48	40.41	42.12	40.45	42.83	1.56	0.702
25-42 d ۲۵-۴۲ روزگی	177.0 ^{b}	168.7 ^{b}	167.3 ^{b}	166.4 ^{b}	158.0^{ab}	145.3 ^{ab}	158.2 ^{ab}	155.5 ^{a}	4.03	0.008
1-42 d ۱-۴۲ روزگی	95.04^{a}	91.51^{ab}	90.89^{ab}	90.22^{abc}	86.54 ^{bc}	86.45 ^{bc}	84.88 ^{bc}	86.58 ^{c}	1.69	0.004
میانگین افزایش وزن بدن (گرم/پرنده/روز) Body weight gain (g/bird/d)										
1-10 d ۱-۱۰ روزگی	24.55	22.50	22.63	22.60	23.30	24.03	22.67	22.70	1.13	0.82
11-24 d ۱۱-۲۴ روزگی	38.40 ^{a}	27.93 ^{c}	29.52 ^{bc}	33.93 ^{abc}	32.71 ^{abc}	35.64 ^{ab}	34.05 ^{abc}	32.65 ^{abc}	1.89	0.02
25-42 d ۲۵-۴۲ روزگی	81.47	74.69	78.17	82.31	78.63	81.06	76.18	79.03	2.36	0.30
1-42 d ۱-۴۲ روزگی	53.56^{a}	46.67^{b}	48.74^{ab}	51.96 ^{a}	50.15^{ab}	52.34^{a}	49.39 ^{ab}	50.15 ^{ab}	1.51	0.02
ضریب تبدیل خوراک Feed conversion ratio										
1-10 d ۱-۱۰ روزگی	0.96	1.05	1.01	1.02	0.97	0.95	1.01	0.97	0.4	0.98
11-24 d ۱۱-۲۴ روزگی	1.06	1.48	1.42	1.22	1.25	1.22	1.31	1.26	0.09	0.09
25-42 d ۲۵-۴۲ روزگی	2.18 ^{bc}	2.27 ^{a}	2.15 ^{ab}	2.02 ^{bc}	2.01 ^{bc}	1.93 ^{c}	2.08 ^{bc}	1.97 ^{c}	0.05	0.001
1-42 d ۱-۴۲ روزگی	1.78 ^{bc}	1.96 ^{a}	1.87 ^{ab}	1.74 ^{bc}	1.73 ^{bc}	1.66 ^{c}	1.78 ^{bc}	1.70 ^{c}	0.043	0.006
Performance index شاخص عملکرد	322.7^{a}	202.2^{d}	252.3^{c}	274.0^{c}	251.5^{c}	297.6^{ab}	279.5^{bc}	291.6^{b}	9.84	0.016

[1] میانگین‌های هر ردیف با حروف غیر مشابه دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشند ($P<0.05$).

[1] Means within same row with different superscripts differ significantly ($P<0.05$).

مطابق با نتایج حاضر، جهرمی و همکاران (Jahromi *et al.*, 2015) گزارش کردند که استفاده از پروبیوتیک در جیره غذایی باعث بهبود شرایط فیزیولوژیکی، ساختار روده‌ای و سیستم ایمنی و در نتیجه عملکرد طیور شد. افزودن پروبیوتیک در جیره سبب ترشح آنزیم‌های گوارشی و در نتیجه بهبود هضم مواد مغذی می‌شود. مطابق با نتایج حاضر، چندراروی و همکاران (Chandra Roy *et al.*, 2015) افزایش وزن بدن و کاهش خوراک مصرفی و بهبود ضریب تبدیل خوراک در جوجه‌های تغذیه شده با جیره حاوی پروبیوتیک نسبت به جوجه‌های تغذیه شده با جیره حاوی آنتی‌بیوتیک را گزارش کردند. این محققین گزارش کردند که آنتی‌بیوتیک‌های محرک رشد ممکن است در شرایط دمای بالای محیطی، برای محرک رشد موثر نباشد.

لین و همکاران (Lin *et al.*, 2006) اثرات مثبت ویتامین‌ها بویژه ویتامین E و C را به کاهش اثرات استرس اکسیداتیو ایجاد شده بوسیله تنش گرمایی ارتباط داد. دمای بالای محیطی بر کاهش جذب و ساخت این ویتامین اثر گذاشته و بنابراین به عنوان یک مکمل جیره‌ای موثر در زمان تنش گرمایی در طیور توصیه می‌شود. عرب عامری و همکاران

(Arab Ameri *et al.*, 2016) با بررسی اثر استفاده از ویتامین E و نعناع فلفی در جوجه‌های گوشتی تحت تنش گرمایی بهبود وزن بدن در پایان دوره پرورشی را گزارش کردند. اسدی و همکاران (Asadi *et al.*, 2017) اثر مثبت استفاده از سطوح مختلف پودر نعناع فلفی (۱/۵، ۳، ۴/۵ و۶ گرم بر کیلوگرم) را بر عملکرد طیور و وزن بدن روزانه در دوره رشد و پایانی گزارش کردند، با اینحال اثر تیمارها بر میزان چربی حفره شکمی معنی‌دار نبود. به نظر می‌رسد اثرات مثبت سطوح مختلف نعناع فلفی بر افزایش وزن بدن به دلیل اثرات آن بر کاهش اختلالات دستگاه گوارش و در نتیجه بهبود سیستم هضمی و بازده خوراک باشد. بعلاوه خاصیت ضدباکتریایی نعناع فلفی ناشی از وجود منتول، از رشد باکتری‌های مضر در سیستم گوارشی جلوگیری می‌کند که منجر به هضم و جذب بهتر خوراک شده و در نتیجه افزایش وزن بدن را بهبود می‌دهد.

شاخص‌های بیوشیمیایی خون

اثر جیره‌های آزمایشی بر پارامترهای بیوشیمیایی خون در ۴۲ روزگی در جدول ۳ نشان داده شده است. جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با جیره حاوی آنتی‌بیوتیک و گروه شاهد مثبت میزان تری‌گلیسرید بیشتری نسبت به دیگر تیمارها داشتند ($P<0.05$). غلظت سرمی کلسترول در جوجه‌های گوشتی دریافت کننده جیره حاوی آنتی‌بیوتیک، ویتامین C و گروه شاهد مثبت نسبت به دیگر تیمارها بالاتر بود ($P<0.05$)، در حالیکه با تیمار ۲۵۰ میلی‌گرم نعناع فلفی تفاوت معنی‌داری نداشتند ($P>0.05$). در جوجه‌های تغذیه شده با جیره حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم نعناع فلفی، پروبیوتیک، ویتامین C و شاهد مثبت، میزان LDL و VLDL به طور معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد مثبت و تیمار حاوی آنتی‌بیوتیک کاهش یافت ($P<0.05$). غلظت گلبول‌های سفید و قرمز خون در جوجه‌های تغذیه شده در گروه شاهد مثبت به طور معنی‌داری نسبت به تیمارهای دیگر کاهش یافت ($P<0.05$)، غلظت هماتوکریت خون در جوجه‌های تغذیه شده با جیره حاوی پروبیوتیک به طور معنی‌داری نسبت به جوجه‌های تغذیه شده با جیره حاوی آنتی‌بیوتیک افزایش یافت ($P<0.05$)، ولی با جوجه‌های گروه شاهد منفی تفاوت معنی‌داری نداشت ($P>0.05$). اثر تیمارهای آزمایشی بر غلظت پروتئین، گلوکز، HDL و هموگلوبین خون معنی‌دار نبود ($P>0.05$).

همانطور که نتایج نشان داد تنش گرمایی به طور معنی‌داری سبب افزایش کلسترول، تری‌گلیسرید، LDL و کاهش گلبول‌های قرمز و هماتوکریت در جوجه‌های گوشتی شد. زو و همکاران (Xu *et al.*, 2018) گزارش کردند که تنش گرمایی می‌تواند به طور مستقیم به گلبول‌های قرمز آسیب برساند و باعث کاهش تعداد آنها در خون شود. از طرفی در این شرایط دمایی آسیب‌های مخاطی باعث ورود تعداد بالایی از باکتری‌ها و سموم به جریان خون شده که در نتیجه سبب کاهش تعداد گلبول‌های قرمز می‌شود. در تطابق با نتایج حاضر، پاندا و همکاران (Panda *et al.*, 2006) کاهش میزان LDL و VLDL جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با جیره حاوی پروبیوتیک را گزارش کردند.

سنتز اسیدهای صفراوی از کلسترول در کبد یک روش بسیار مهمی از دفع کلسترول می‌باشد. پروبیوتیک‌ها سبب متلاشی شدن اسیدهای صفراوی و دکونژوگه کردن آنها می‌شوند و با کاهش pH در روده می‌توانند بر کاهش میزان کلسترول در شرایط دمایی بالا موثر باشند. قابلیت حل اسیدهای صفراوی غیر کونژوگه در pH پایین، کاهش می‌یابد، بنابراین جذب آنها از روده کم و از طریق مدفوع دفع می‌شوند. بنابراین اسیدهای صفراوی در کبد به کلسترول تبدیل و وارد بافتها می‌شود و از اینرو غلظت آنها در خون کاهش می‌یابد (Alimohamadi *et al.*, 2014).

شریفی و همکاران (Sharifi *et al.*, 2013) گزارش کردند که افزایش میزان تری‌گلیسرید، LDL و کلسترول کل سرم در جوجه‌های تغذیه شده با جیره حاوی آنتی‌بیوتیک ممکن است در نتیجه کاهش رشد و فعالیت میکروفلور روده مورد نیاز برای سوخت و ساز نمک‌های صفراوی باشد و در نتیجه باعث کاهش دکونژگه شدن نمک‌های صفراوی می‌شود. دکونژگه شدن نمک‌های صفراوی موجب کاهش اختلال در امولسیون چربی و جذب لیپید می‌شود و در نتیجه باعث افزایش تری‌گلیسرید، کلسترول کل و LDL کلسترول سرم می‌شود. کمبود اکسیژن باعث افزایش گونه‌های فعال اکسیژنی یا رادیکال‌های آزاد در سلول و میتوکندری و در نتیجه پراکسیداسیون پروتئین و لیپیدها می‌شوند، که در صورت عدم استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها، استرس اکسیداتیو و آسیب بافتی ایجاد خواهد شد (Blagojeviüs, 2007). زیرا در این شرایط سطح پلاسمایی ویتامین و مواد معدنی درگیر در سیستم آنتی اکسیدانتی بدن کاهش می‌یابد. ویتامین C به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی در حفاظت سلول‌ها در برابر آسیب اکسیداتیو نقش مهمی را بازی می‌کند، که از طریق به دام انداختن رادیکال‌های آزاد باعث جمع‌آوری و حذف آنها از محیط عمل سلول‌ها می‌شود.

عرب عامری و همکاران (Arab Ameri *et al.*, 2016) اکبری و ترکی (Akbari and Torki, 2014) گزارش کردند که نعناع فلفی از طریق افزایش غلظت HDL و کاهش کلسترول و تری‌گلیسرید، اثرات مثبتی بر متابولیسم لیپید دارند. اثرات کاهشی گیاهان دارویی بر پارامترهای لیپیدهای را به عملکرد آنها بر آنزیم هیدروکسی متیل گلوکوتاریل کوآنزیم آ در سلول‌های کبدی مربوط دانستند.

جدول ۳- اثر تیمارهای آزمایشی بر فراسنجه‌های بیوشیمی و هماتوﺅژی جوجه‌های گوشتی در ۴۲ روزگی[۱]

Table 3- Effects of different dietary on biochemical and hematological parameters in broilers in 42 days[1]

فراسنجه‌ها	جیره‌های آزمایشی Experimental diets									
							عصاره نعناع فلفی Peppermint extract			
فراسنجه‌ها	شاهد منفی	شاهد مثبت	آنتی‌بیوتیک ویرجینامایسین	پروبیوتیک پروتکسین	ویتامین- C	ویتامین-E	۲۵۰ میلی-گرم	۵۰۰ میلی‌گرم	اشتباه استاندارد	سطح احتمال
Parameters	Negative control	Positive control	Antibiotic, virginiamycin	Probiotic, protexin	Vit C	Vit E	250 mg	500 mg	SEM	P-value
Total protein (g/dL) پروتئین کل	3.75	3.40	3.55	4.00	4.12	3.50	3.92	4.03	0.2	0.55
Glucose (mg/dL) گلوکز	219.06	188.45	204.51	192.11	210.80	209.95	216.71	190.91	9 .47	0.17
Triglyceride (mg/dL) تری‌گلیسرید	100.61 [b]	148.18 [ab]	154.29 [a]	115.72[b]	97.10 [c]	125.85[bc]	126.51[bc]	106.54[c]	9.89	0.01
Cholesterol (mg/dL) کلسترول	108.26[c]	158.25[a]	164.22[a]	124.60[b]	123.01 [b]	154.27 [a]	148.14 [ab]	106.16[c]	8.89	0.01
HDL[2] (mg/dL) لیپو پروتئین‌های با چگالی بالا	52.54	38.85	37.75	55.88	46.52	48.62	45.24	62.94	77.7	0.44
LDL[3] (mg/dL) لیپو پروتئین‌های با چگالی کم	35.60 [c]	89.86[a]	95.61[a]	45.58[b]	57.07[b]	80.49 [ab]	77.49 [ab]	22.5[d]	9.73	0.01
VLDL[4] (mg/dL) لیپو پروتئین‌های با چگالی خیلی کم	20.12[b]	29.6[a]	30.86[a]	23.14[b]	19.42 [b]	25.17 [ab]	25.30 [ab]	21.31 [b]	1.97	0.01
WBC[5] (× 10^3/µL) گلبول‌های سفید خون	16174[a]	15292[b]	15880[ab]	16340 [a]	16210[a]	16276[a]	15820 [ab]	16158[a]	1.97	0.022
RED[6] (× 10^3/µL) گلبول‌های قرمز خون	2.48[ab]	2.20[b]	2.38[ab]	2.70[a]	2.54[a]	2.54[a]	2.52 [a]	2.68 [a]	0.4	0.029
Hematocrit (%) هماتوکریت	45.60 [ab]	39.206[bc]	36.40[c]	51.60[a]	39.60[bc]	39.60[bc]	41.60[bc]	41.80[bc]	0.09	0.013
Hemoglobin (mg/dL) هموگلوبین	13.72	13.28	14.88	15.30	14.00	14.12	14.02	13.84	0.05	0.58

[۱] میانگین‌های هر ردیف با حروف غیر مشابه دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشند ($P<0.05$).

[1] Means within same row with different superscripts differ significantly ($P<0.05$).
[2] High-density lipoproteins
[3] low-density lipoproteins
[4] very-low-density lipoproteins
[5] White Blood Cells
[6] Re*d* Blood Cells

پاسخ سیستم ایمنی

اثر استفاده از تیمارهای آزمایشی بر وزن اندام‌های لمفوئیدی، هتروفیل، لنفوسیت، نسبت هتروفیل به لنفوسیت و درصد چربی حفره شکمی جوجه‌های گوشتی در ۴۲ روزگی، در جدول ۴ نشان داده شده است. میزان چربی حفره شکمی در جوجه‌های گروه شاهد مثبت نسبت به دیگر تیمارها بالاتر بود (P <۰/۰۵)، با این حال با جوجه‌های گروه شاهد و پرندگان تغذیه شده با جیره حاوی پروبیوتیک و ۲۵۰ میلی‌گرم نعناع فلفی تفاوت معنی‌دار نداشت (P >۰/۰۵). جوجه‌های گروه شاهد مثبت و تغذیه شده با جیره حاوی آنتی‌بیوتیک درصد هتروفیل بالاتری را نسبت به دیگر تیمارها داشتند (P <۰/۰۵). درصد لنفوسیت در جوجه‌های گروه شاهد مثبت و دریافت کننده خوراک حاوی آنتی‌بیوتیک به طور معنی‌داری نسبت به شاهد منفی و جوجه‌های تغذیه شده با جیره حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نعناع فلفی کاهش یافت (P <۰/۰۵). بیشترین نسبت هتروفیل به لنفوسیت خون در جوجه‌های گروه شاهد مثبت دیده شد که با دیگر تیمارها بجز جوجه‌های تغذیه شده با جیره حاوی آنتی‌بیوتیک تفاوت معنی‌داری نداشت (P <۰/۰۵). اثر تیمارهای آزمایشی بر وزن طحال، تیموس و بورس فایبرسیوس در پایان دوره آزمایشی معنی‌دار نبود (P >۰/۰۵).

زو و همکاران (Xu *et al*., 2018) گزارش کردند که جوجه‌های تحت تنش گرمایی میزان لمفوسیت کمتر و تعداد هتروفیل بیشتری در مقایسه با گروه شاهد داشتند که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت داشت. چندراوی و همکاران (Chandra Roy *et al*., 2015) کاهش معنی‌دار میزان چربی حفره شکمی جوجه‌های تغذیه شده با جیره حاوی پروبیوتیک در مقایسه با تیمار آنتی‌بیوتیک و گروه شاهد را گزارش کردند. عوامل تنش‌زا با تحریک ترشح هورمون آدرنوکورتیکوتروپین (ACTH) و هورمون‌های غدد فوق کلیوی موجب افزایش نسبی تعداد هتروفیل و لنفوسیت در طیور می‌شوند. بر این اساس نسبت هتروفیل به لنفوسیت شاخص مهمی در ارزیابی تنش و سطح ایمنی بدن مورد استفاده قرار می‌گیرد. هر چه این نسبت کمتر باشد به همین مقدار نیز سطح ایمنی بدن بالا بوده و احتمال مقاومت در مقابل عوامل بیماری‌زا بهبود می‌یابد. استفاده از پروبیوتیک در جیره با تغییر و تعادل مناسب جمعیت میکروبی، افزایش رشد باکتری‌های مفید و ایجاد محیطی سالم در دستگاه گوارش پرنده سبب جذب بهتر و بیشتر مواد مغذی و بهبود پاسخ ایمنی می‌شوند. یکی از مهمترین فرایندها در پاسخ‌های ایمنی جوجه‌های گوشتی به شرایط استرس‌زا، اتصال باکتری و عوامل خارجی به هتروفیل‌ها می‌باشد که اولین خط دفاعی در پرندگان هستند. این عامل سبب افزایش رادیکال‌های آزاد همانند سوپراکسید و پراکسیدهیدروژن می‌شوند. حضور این رادیکال‌های آزاد در فضای داخل سلولی، به سلول‌های ایمنی و بافت‌های اطراف آسیب وارد می‌کنند (Dalólio *et al*., 2012). ویتامین‌هایی مانند ویتامین E و C به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های اصلی در خون با رادیکال‌های پروکسی واکنش نشان می‌دهند. این واکنش‌ها اثرات رادیکال‌های آزاد را کاهش می‌دهند و از بافت‌ها محافظت می‌کنند.

یارمحمدی باربارستانی و همکاران (Yarmohammadi Barbarestani *et al*., 2017) کاهش نسبت هتروفیل در جوجه‌های تحت تنش گرمایی تغذیه شده با جیره حاوی عصاره الکلی نعناع فلفی را گزارش کردند. در این مطالعه اثر تیمارهای آزمایشی بر وزن اندام‌های طحال و تیموس معنی‌دار نبود. اثرات محافظت ایمنی گیاهان دارویی در مطالعات دیگر (Tavakolinasab and Taherpour, 2017) نیز گزارش شده است. اسانس‌های گیاهی موجود در گیاهان دارویی به عنوان ترکیبات ضدتنش کاربرد دارند، افزودنی‌های گیاهی با داشتن اثرات فارماکولوژی متعدد در بهبود عملکرد سیستم ایمنی مؤثر هستند و می‌توانند محیط را برای تهاجم عوامل خارجی نامناسب سازند (Tavakolinasab and Taherpour, 2017).

اثر تیمارهای آزمایشی بر میانگین تیترآنتی‌بادی نیوکاسل، آنفلوآنزا و گامبورو ۱۰ و ۲۰ روز بعد از آخرین واکسیناسیون در جدول ۵ گزارش شده است. بیشترین میزان تیتر ثانویه علیه بیماری نیوکاسل، مربوط به جوجه‌های تغذیه شده با جیره‌های حاوی پروبیوتیک و ویتامین C بود که با دیگر تیمارها به استثنای پرنده‌های تغذیه شده با جیره حاوی ویتامین E و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خوراک تفاوت معنی‌داری داشتند (P<۰/۰۵). اثر جیره‌های آزمایشی بر تیتر آنتی‌بادی آنفلوآنزا در ۲۰ روز بعد از واکسیناسیون معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). کمترین تیتر آنتی‌بادی آنفلوآنزا در جوجه‌های تغذیه شده با جیره حاوی آنتی‌بیوتیک و گروه شاهد مثبت و منفی مشاهده شد (P<۰/۰۵)، در حالیکه دیگر تیمارهای آزمایشی اثر معنی‌داری بر افزایش میزان تیتر آنتی‌بادی این بیماری در جوجه‌های گوشتی داشتند (P<۰/۰۵). جوجه‌های تغذیه شده با جیره‌های حاوی پروبیوتیک، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم عصاره نعناع فلفلی بیشترین میزان تیتر اولیه علیه واکسن بیماری گامبور را داشتند (P<۰/۰۵)، در حالیکه جوجه‌های تغذیه شده با جیره حاوی آنتی‌بیوتیک و گروه شاهد مثبت میزان تیتر آنتی بادی اولیه کمتری را نشان دادند (P<۰/۰۵). جوجه‌های تغذیه شده با جیره حاوی پروبیوتیک و ویتامین C بیشترین میزان تیتر ثانویه آنتی‌بادی علیه بیماری گامبور را در مقایسه با دیگر تیمارها نشان دادند (P<۰/۰۵).

تنش گرمایی یکی از عوامل موثر بر کاهش سیستم ایمنی در طیور می‌باشد، به طوری‌که شیوع بیماری‌های مسری و عفونی همانند بیماری نیوکاسل و گامبورو در فصل گرما در کشورهای گرمسیری نسبتا" بیشتر است. تنش گرمایی با کاهش سیتوکین‌های T کشنده که نقش مهمی در تولید آنتی‌بادی دارند، سبب کاهش سنتز آنتی‌بادی می‌شود (Mashaly *et al*., 2004).

جدول ٤. اثر تیمارهای آزمایشی بر درصد هتروفیل و لنفوسیت و وزن نسبی اندام‌های لمفوئیدی و چربی حفره شکمی (بر حسب درصد وزن زنده) در جوجه‌های گوشتی در ۴۲ روزگی[۱]

Table 4- Effects of different dietary treatment on heterophil and lymphocyte percentage and relative weights of lymphoid organs and abdominal fat (% of live body weight) in broilers at 42 days

	جیره‌های آزمایشی Experimental diets									
							عصاره نعناع فلفی Peppermint extract			
فراسنجه‌ها Parameters	شاهد منفی Negative control	شاهد مثبت Positive control	آنتی‌بیوتیک ویرجینامایسین Antibiotic, virginiamycin	پروبیوتیک پروتکسین Probiotic, protexin	ویتامین C- Vit C	ویتامین- E Vit E	۲۵۰ میلی- گرم 250 mg	۵۰۰ میلی‌گرم 500 mg	اشتباه استاندارد SEM	سطح احتمال P-value
Abdominal fat چربی حفره شکمی	1.1070^{ab}	1.4090^{a}	1.019^{ab}	0.8813^{b}	0.8879^{b}	0.7794^{b}	1.0248^{ab}	0.7817^{b}	0.128	0.0021
Heterophil هتروفیل	26.20^{b}	41.80^{a}	39.60^{a}	28.00^{b}	31.60^{b}	26.00^{b}	30.60^{b}	25.40^{b}	2.733	0.0001
Lymphocyte لنفوسیت	68.20^{a}	55.40^{c}	60.20^{b}	69.60^{a}	65.80^{ab}	64.60^{ab}	65.60^{ab}	71.40^{a}	2.940	0.002
H/L هتروفیل/لنفوسیت	0.392^{c}	0.772^{a}	0.650^{ab}	0.416^{c}	0.490^{bc}	0.407^{c}	0.485^{bc}	0.361^{c}	0.0622	0.0008
Spleen طحال	0.1236	0.1318	0.1154	0.1662	0.1389	0.1345	0.1330	0.1388	0.019	0.312
Thymus تیموس	0.1250	0.1148	0.1426	0.1162	0.1343	0.1232	0.1288	0.1160	0.019	0.102
Bursa بورس	0.2799	0.2842	0.2099	0.2354	0.2411	0.2577	0.3354	0.2414	0.04	0.121

[۱]میانگین‌های هر ردیف با حروف غیر مشابه دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشند ($P<0.05$).

[1]Means within same row with different superscripts differ significantly ($P<0.05$).

این کاهش می‌تواند در نتیجه افزایش سیتوکین‌های التهابی در شرایط تنش‌زا باشد، که با تحریک هیپوتالاموس سبب تولید کورتیکوتروپین می‌شوند. مطابق با نتایج مطالعه حاضر، افزایش تیتر آنتی‌بادی علیه بیماری آنفلوآنزا (El-Baky, 2013) و بیماری نیوکاسل و گامبورو (Landy and Kavyani, 2013) در جوجه‌های تغذیه شده با جیره حاوی پروبیوتیک نسبت به گروه شاهد گزارش شد. پروبیوتیک-ها با اثر بر میکروفلور روده در توسعه و وضعیت فیزیولوژیکی سیستم ایمنی هومورال و سلولی نقش دارند و بنابراین نقش مهمی در تعدیل سیستم ایمنی ایفا می‌کنند. در مطالعه اورال توپلو و همکاران (Oral Toplu *et al.*, 2014) استفاده از اسکوربیک اسید در جیره، سبب افزایش تولید آنتی‌بادی علیه بیماری نیوکاسل در مقایسه با جوجه‌های گوشتی تحت تنش گرمایی شد. ویتامین‌ها به عنوان تعدیل کننده‌های سیستم ایمنی در سوخت و ساز داخلی بدن جهت بهبود عملکرد ایمنی و مقاومت به عفونت در طیور و دیگر حیوانات عمل می‌کنند. ویتامین C یک آنتی‌اکسیدانت مهم در سیستم بیولوژیکی است که می‌تواند اثرات مضر تنش گرمایی بر سیستم ایمنی را کنترل کند (Lin *et al.*, 2006).

نتایج مربوط به ایمنی هومورال (تست SRBC) در جدول ۶ آورده شده است. نتایج نشان داد که ایمنوگلوبولین‌های G و M حاصل از تزریق SRBC در ایمنی اولیه تیمارها معنی‌دار بودند (P <۰/۰۵). به طوری‌که جوجه‌های تغذیه شده با جیره حاوی پروبیوتیک میزان IgG بیشتری در مقایسه با جوجه‌های گروه شاهد مثبت داشتند (P <۰/۰۵). جوجه‌های تغذیه شده با جیره حاوی ۲۵۰ میلی‌گرم عصاره نعناع فلفی و گروه شاهد مثبت میزان IgM کمتری در مقایسه با دیگر تیمارها داشتند (P <۰/۰۵).

جدول ۵- اثر تیمارهای آزمایشی بر عیار پادتن علیه بیماری‌های نیوکاسل، گامبوزو و آنفلوآنزا در جوجه‌های گوشتی در ۴۲ روزگی (log_2)[۱]

Table 5- Effect of experimental treatment on serum HI-antibody titers against Newcastle, Gambaro and Influenza vaccine in broilers (log 2)

	فراسنجه‌ها Parameters	جیره‌های آزمایشی Experimental diets: شاهد منفی Negative control	شاهد مثبت Positive control	آنتی‌بیوتیک Antibiotic	پروبیوتیک Probiotic	ویتامین-C Vit C	ویتامین-E Vit E	عصاره نعناع فلفی Peppermint extract: ۲۵۰ میلی-گرم 250 mg	۵۰۰ میلی-گرم 500 mg	اشتباه استاندارد SEM	سطح احتمال P-value
نیوکاسل Newcastle	تیتر اولیه Primary titer	3.75	2.5	3.5	2.75	3.25	3.50	2.50	4.00	0.507	0.236
	تیتر ثانویه Secondary titer	1.00^{c}	1.00^{c}	1.25^{bc}	2.50^{a}	2.50^{a}	2.00^{ab}	1.50^{bc}	2.00^{ab}	0.31	0.0007
آنفلوآنزا Influenza	تیتر اولیه Primary titer	8.25	7.00	7.50	6.75	7.25	7.5	7.5	7.75	0.64	0.82
	تیتر ثانویه Secondary titer	1.75^{b}	1.50^{b}	1.75^{b}	3.75^{a}	3.75^{a}	3.25^{a}	3.00^{a}	3.50^{a}	0.82	0.0001
گامبورو Gambaro	تیتر اولیه Primary titer	3792.5^{abc}	3403.0^{bc}	2888.3^{c}	4814.8^{a}	4114.3^{ab}	3887.5^{abc}	4504.3^{a}	4738.3^{a}	319.74	0.004
	تیتر ثانویه Secondary titer	1590.3^{c}	1554.8^{c}	1551.8^{c}	4148.5^{a}	3854.5^{a}	2323.8^{bc}	1785.0^{bc}	2553.3^{b}	259.82	0.001

[۱]میانگین‌های هر ردیف با حروف غیر مشابه دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشند ($P<0.05$).

[1]Means within same row with different superscripts differ significantly ($P<0.05$).

بالاترین میزان کل آنتی‌بادی‌ها در ایمنی اولیه مربوط به جوجه‌های تغذیه شده با جیره حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم عصاره نعناع فلفی بود (P ۰/۰۵>). با اینحال جوجه‌های گروه شاهد مثبت میزان کمتری از IgM در ایمنی ثانویه داشتند که با تیمار ۲۵۰ میلی‌گرم عصاره نعناع فلفی تفاوت معنی‌داری نداشتند (P>۰/۰۵). بیشترین مجموع آنتی‌بادی در ایمنی ثانویه در جوجه‌های تغذیه شده با جیره حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم عصاره نعناع فلفی و پروبیوتیک در مقایسه با گروه شاهد مثبت و جوجه-های تغذیه شده با جیره حاوی ۲۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مشاهده شد (P <۰/۰۵).

آتیا و همکاران (Attia *et al*., 2009) گزارش کردند که سطح ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامینC از اثرات منفی تنش گرمایی در طیور جلوگیری کرده و سیستم ایمنی هومورال را در برابر SRBC بهبود داد. افزایش میزان IgM در برابر SRBC جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با جیره حاوی پروبیوتیک در مطالعه رهی و همکاران (Rhee *et al*., 2004) مشاهده شد. یارمحمدی باربارستانی و همکاران (Yarmohammadi Barbarestani *et al*., 2017) گزارش کردند که تیتر آنتی‌بادی سرمی بر علیه SRBC در پرندگان تغذیه شده با جیره حاوی عصاره نعناع فلفی نسبت به جوجه‌های گروه شاهد بالاتر بود. گیاهان دارویی با داشتن متابولیت‌های ثانوی، اثرات مثبتی بر عملکرد رشد و در نتیجه افزایش عملکرد ایمنی دارد. اثرات مثبت نعناع به دلیل داشتن ترکیبات فعالی مانند کارواکرول، فلاونوئیدها و منتول است. فلاونوئیدها با اثرات آنتی‌اکسیدانی خواص محافظتی در برابر رادیکال-های آزاد دارند. غشای مخاطی دستگاه گوارش نقش مهمی در جلوگیری از ورود پادگن‌ها و میکروارگانیسم‌های مضر و حذف آنها از این عضو ایفا کرده و به طور همزمان در جذب انتخابی مواد مغذی نیز موثر می‌باشد. دست‌کاری جمعیت میکروبی دستگاه گوارش می‌تواند به شکل قابل ملاحظه ای از اتصال و جایگزینی باکتری‌های مضر در این غشاء، از طریق رقابت با آنها در به دست آوردن مواد مغذی، تولید مواد ضد باکتریایی و تحریک تولید پادتن‌های اختصاصی جلوگیری کند.

جدول٦- اثر جیره‌های آزمایشی بر پاسخ ایمنی هومورال در مقابل گلبول قرمز خون گوسفندی (log_2) در جوجه‌های گوشتی در سن ۴۲ روزگی

Table 6- Effect of dietary treatment on immune humoral response against sheep red blood cells (log_2) in broilers at 42 d of age

	فراسنجه‌ها Parameters	شاهد منفی Negative control	شاهد مثبت Positive control	آنتی‌بیوتیک Antibiotic	پروبیوتیک Probiotic	ویتامین-C Vit C	ویتامین-E Vit E	عصاره نعناع فلفلی Peppermint extract: ۲۵۰ میلی-گرم 250 mg	عصاره نعناع فلفلی Peppermint extract: ۵۰۰ میلی-گرم 500 mg	اشتباه استاندارد SEM	سطح احتمال P-value
		جیره‌های آزمایشی Experimental diets									
ایمنی اولیه Primary titer	ایمنوگلوبولین G IgG	2.39[ab]	1.86[c]	2.24[bc]	2.80[a]	2.60[ab]	2.66[ab]	2.58[ab]	2.76[ab]	0.159	0.005
	ایمنوگلوبولین M IgM	2.92[a]	2.19[b]	2.74[a]	2.95[a]	2.91[a]	2.93[a]	2.92[b]	3.03[a]	0.128	0.002
	مجموع آنتی-بادی Total antibody	3.70[abc]	3.05[b]	3.52[bc]	3.88[ab]	3.78[abc]	3.82[abc]	3.45[c]	3.90[a]	0.114	0.002
ایمنی ثانویه Secondary titer	ایمنوگلوبولین G IgG	2.48	2.24	2.39	2.62	2.40	2.66	2.36	2.53	0.166	0.674
	ایمنوگلوبولین M IgM	2.86[a]	2.47[b]	2.95[a]	3.07[a]	2.91[a]	2.87[a]	2.73[ab]	3.09[a]	0.126	0.04
	مجموع آنتی-بادی Total antibody	3.70[ab]	3.38[c]	3.74[ab]	3.87[a]	3.69[ab]	3.78[ab]	3.56[bc]	3.87[a]	0.091	0.012

[۱]میانگین‌های هر ردیف با حروف غیر مشابه دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشند ($P<0.05$).

[1]Means within same row with different superscripts differ significantly ($P<0.05$).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که تیمارهای حاوی ویتامین E و سطح بالای عصاره نعناع فلفلی تأثیر بهتری بر عملکرد رشد جوجه‌های گوشتی تحت چالش تنش گرمایی داشت. همچنین سطح بالای عصاره نعناع فلفلی (۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره غذایی) مشابه ویتامین C و E و پروبیوتیک سبب بهبود پاسخ ایمنی شد. با توجه به نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر، بنابراین می‌توان گفت که استفاده از سطح ۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم عصاره گیاه نعناع فلفلی در جیره غذایی را به عنوان راهکاری برای مقابله با تنش گرمایی در جیره جوجه‌های گوشتی پیشنهاد داد.

Refrences

1. Akbari, M., and M. Torki. 2014. Effects of dietary chromium picolinate and peppermint essential oil on growth performance and blood biochemical parameters of broiler chicks reared under heat stress conditions. International Journal of Biometeorology, 58(6):1383-1391.
2. Akhbari, M., H. Batooli, and M. Mozdianfard. 2012. Comparative study of composition and biological activity of SDE prepared essential oil from flowers and fruits of two Hypericum species from central Iran. Natural Product Research, 26(3):193-202.
3. Alimohamadi, K., K. Taherpour, H. A. Ghasemi and F. Fatahnia. 2014. Comparative effects of using black seed

(*Nigella sativa*), cumin seed (*Cuminum cyminum*), probiotic or prebiotic on growth performance, blood haematology and serum biochemistry of broiler chicks. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 98(3):538–546.

4. Al-Kassie, G. A. M., and R. A. Abd-Aljaleel. 2008. Effect of probiotic (Aspergillus niger) and prebiotic (Taraxacum officinale) on blood picture and biochemical properties of broiler chicks. Poultry Science, 7(12):1182-1184.
5. Amiri M, H. A. Ghasemi, I. Hajkhodadadi, and A. H. Khaltabadi Farahani. 2019. Efficacy of guanidinoacetic acid at different dietary crude protein levels on growth performance, stress indicators, antioxidant status, and intestinal morphology in broiler chickens subjected to cyclic heat stress. Animal Feed Science and Technology, 254:114208.
6. Arab Ameri, S., F. Samadi., B. Dastar, and S. Zarehdaran. 2016. Efficiency of Peppermint (*Mentha piperit*a) Powder on Performance, Body Temperature and Carcass Characteristics of Broiler Chickens in Heat Stress Condition. Iranian Journal of Applied Animal Science, 6(4):943-950.
7. Asadi, N., S. D. Husseini., M. T. Tohidian., N. Abdali., A. Mimandipoure., M. Rafieian-Kopaei, and M. Bahmani. 2017. Performance of broilers supplemented with peppermint (*Mentha piperita* L.) powder. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 22(4):703-706.
8. Attia, Y. A., R. A. Hassan, and M. A. Qota. 2009. Recovery from adverse effects of heat stress on slow-growing chicks in the tropics: Effect of ascorbic acid and different levels of betaine. Tropical Animal Health and Production, 41(5):807-818.
9. Blagojeviüs, D. P. 2007. Antioxidant systems in supporting environmental and programmed adaptations to low temperatures. Cryo Letters, 28(3):137–150.
10. Borges, S. A., D. Fischer., A. V. Silva., A. Majorka., D.M. Hooge, and K. R. Cummings. 2004. Physiological responses of broiler chickens to heat stress and dietary electrolyte balance (sodium plus potassium minus chloride, miliequivalents per kilogram). Poultry Science, 83(9):1551-1558.
11. Chandra Roy, B., S. D. Chowdhury, and S. M. Lutful Kabir. 2015. Effects of feeding Bacillus subtilis to heat stressed broiler chickens with or without an antibiotic growth promoter. Asian Journal of Medical and Biological Research, 1(1):80-88.
12. Dalólio, F. S., L. F. T. Albino., H. J. Lima., J. N. D. Silva, and J. Moreira. 2015. Heat stress and vitamin E in diets for broilers as a mitigating measure. Acta Scientiarum Animal Science, 37(4):419-427.
13. El-Baky, A. A. 2013. Clinicopathological and immunological effects of multistrain probiotic on broiler chicken vaccinated against avian influenza virus. Global Veterinaria, 10(5):534-541.
14. Elliott, R. J. 1984. Ektachem DT-60 Analyzer. Physician's Leading Computation 2:6.
15. Farnad, N., R. Heidari, and B. Aslanipour. 2014. Phenolic composition and comparison of antioxidant activity of alcoholic extracts of peppermint (*Mentha piperita*). Food Measure, 8:113–121.
16. Fazelinasab B., N. Moshtaghi and M Forouzandeh. 2019. Effect of solvent extraction on phenol, flavonoids and antioxidant activity of some iranian native herbs. Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences. 27(3):14-26. (In Persian).
17. Habibian, M., S. Ghazi., M. M. Moeini, and A. Abdolmohammadi. 2014. Effects of dietary selenium and vitamin E on immune response and biological blood parameters of broilers reared under thermoneutral or heat stress conditions. International Journal Biometeorology, 58(5):741–752.
18. Jahromi, M. F., Y. W. Altaher, P. Shokryazdan., R. Ebrahimi., M. Ebrahimi., Z. Idrus., V. Tufarelli. And J. B. Liang. 2015. Dietary supplementation of a mixture of Lactobacillus strains enhances performance of broiler chickens raised under heat stress conditions. International Journal Biometeorology, 60(7):1099-110.
19. Khodadust, M. R., F, Samadi., F. Ganji., Y. Jafari Ahangari, and G. H. Asadi. 2015. Effects of Peppermint (*Mentha piperita* L.) Alcoholic Extract on Carbon Tetrachloride-induced Hepatotoxicity in Broiler Chickens Under Heat Stress Condition. Poultry Science Journal, 3(1):1-16.
20. Landy, N. and A. Kavyani. 2013. Effects of Using a Multi Strain Probiotic on Performance, Immune Responses and Cecal Microflora Composition in Broiler Chickens Reared Under Cyclic Heat Stress Condition. Iranian Journal of Applied Animal Science, 3(4):703-708.
21. Lara, L. J. and M. H. Rostagno. 2013. Impact of heat stress on poultry production. Animals, 3(2):356–369.
22. Li, Y., Y. Liu, A. Ma, Y. Bao, M. Wang, and Z. Sun. 2017. *In vitro* antiviral, anti-inflammatory, and antioxidant activities of the ethanol extract of *Mentha piperita* L. Food Science and Biotechnology, 26:1675–1683.
23. Liao, X. D., G. Ma., J. Cai., Y. Fu., X. Y. Yan., X. B. Wei, and R. J. Zhang. 2015. Effects of Clostridium butyricum on growth performance, antioxidation, and immune function of broilers. Poultry Science, 94(4):662–667.
24. Lin, H., H.C. Jlao., J. Buyse, and E. Decuypere. 2006. Strategies for preventing heat stress in poultry. Word Poultry Science Journal, 62(1):71- 85.
25. Lucas, A. M. and C. Jamroz. 1961. Atlas of avian hematology. Agriculture Monograp, 25, USDA, Washington, DC.
26. Mashaly, M. M., G. L. Hendricks., M. A. Kalama., A. E. Gehad., A. O. Abbas. and P. H. Patterson, 2004. Effect of heat stress on production parameters and immune responses of commercial laying hens. Poultry Science, 83(6):889–894 .
27. Oral Toplu, H. D. O., R. Tunca., S. U. Aypak., F. Coven., E. T. Epikmen., S. Karaarslan1. and O. Yagin. 2014.

Effects of Heat Conditioning and Dietary Ascorbic Acid Supplementation on Heat shock Protein 70 Expression, Blood Parameters and Fear-Related Behavior in Broilers Subjected to Heat Stress. Acta Scientiae Veterinariae, 42:1179.

28. Panda A. K., S. V. R. RAO., M. V. RAJU. And S. R. Sharm. 2006. Dietary supplementation of Lactobacillus sporogenes on performance and serum biochemico-lipid profile of broiler chickens. Journal Poultry Science, 43(3):235-240.
29. Pourhosseini, Z., A. Qotbi., A., Seidavi., V. Laudadio., G. Centoducati. and V. Tufarell. 2014. Effect of different levels of dietary sweet orange (*Citrus sinensis*) peel extract on humoral immune system responses in broiler chickens. Animal Science Journal, 86(1):105-110.
30. Rahimi, S. and A. Khaksefidi. 2006. A comparison between the effects of a probiotic (Bioplus 2B) and an antibiotic (virginiamycin) on the performance of broiler chickens under heat stress condition. Iranian Journal of Veterinary Research, University of Shiraz, 7:23-28.
31. Rhee, K. J., P. Sethupathi., A. D Riks., D. K. Lanning. and K. L. Night. 2004. Role of commensal bacteria in development of gut-associated lymphoid tissues and preimmune antibody repertoire. Journal of Immunology, 172(2):1118-1124.
32. Rostami, F., H. A. Ghasemi, and K. Taherpour. 2015. Effect of *Scrophularia striata* and *Ferulago angulata*, as alternatives to virginiamycin, on growth performance, intestinal microbial population, immune response, and blood constituents of broiler chickens. Poultry Science, 94:2202–2209.
33. SAS Institute. 2001. SAS User's Guide: Statistics. Version 8.SAS Institute Inc., Cary, North Carolina.
34. Sharifi, S. D.,S. H. khorsandi., A. A. Khadem., A. salehi, and H. Moslehi. 2013. The effect of medicinal plants on the performance and blood biochemical traits and ileal microflora of broiler chicks. The journal Veterinarski arhiv, 83(1):69-80.
35. Sohail, M. U., M. E. Hume., J. A. Byrd., D. J. Nisbet., A. Ijaz., A. Sohail., M. Z. Shabbir. And H. Rehman. 2012. Effect of supplementation of prebiotic mannan-oligosaccharides and probiotic mixture on growth performance of broilers subjected to chronic heat stress. Poultry Science, 91(9):2235–2240.
36. Tavakolinasab, F. and K. Taherpour. 2017. The Comparative Effect of *Berberis Voulgaris* Seed, Symbiotic and Virginiamycin (VM) on Performance and Immune Response of Broilers. Iranian Journal of Animal Science Research, 9(2):196-209.
37. Xu, Y., L. Xiaodan., L. Zhipeng., Z. Xiquan. and L. Qingbin. 2018. Effect of chronic heat stress on some physiological and immunological parameters in different breed of broilers. Poultry Science, 97(11):4073–4082.
38. Yarmohammadi Barbarestani, S., F. Samadi., S. Hassani, and G. Asadi. 2017. Effects of Encapsulated Nano- and Microparticles of Peppermint (*Mentha piperita*) Alcoholic Extract on the Growth Performance, Blood Parameters and Immune Function of Broilers under Heat Stress Condition. Iranian Journal of Applied Animal Science, 7(4):669-677.